

令和4～5年度厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「水道水及び原水における化学物質等の実態を踏まえた水質管理の向上に資する研究」
分担研究報告書

指標ウイルスを用いたリスク管理方法の検討
－ 微生物（ウイルス）分科会 －

研究分担者	片山浩之	東京大学 大学院工学系研究科
	白崎伸隆	北海道大学 大学院工学研究院
	増田貴則	国立保健医療科学院 統括研究官
	三浦尚之	国立保健医療科学院 生活環境研究部
研究協力者	小田琢也	神戸市水道局 水質試験所
	齊藤巧介	神奈川県企業庁 水道水質センター
	佐藤啓貴	埼玉県企業局 行田浄水場
	田中宏憲	千葉県企業局 水質センター
	藤原俊一郎	京都市上下水道局 技術監理室 水質管理センター
	鳥居将太郎	東京大学 大学院工学系研究科
	Vu Duc Canh	東京大学 大学院工学系研究科
	Miaomiao Liu	東京大学 大学院工学系研究科
	佐野大輔	東北大学 大学院工学研究科
	門屋俊祐	東京大学 大学院工学系研究科
三浦耀平	東北大学 大学院工学研究科	

研究要旨

本研究では、粉末活性炭吸着と UF 膜濃縮の組み合わせ条件を改良した濃縮法と PMAx-Enhancer-PCR 法及び ICC-PCR 法によるウイルス定量を適用することにより、水道原水 A における感染力を有する水系感染症ウイルスの存在実態調査を実施した。PCR 法単独によるウイルス定量では、採水時期による濃度変動が見られたものの、アデノウイルス、エンテロウイルス、ロタウイルスが 10^{3-5} copies/L 程度、トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) が 10^{6-7} copies/L 程度存在していることが確認された。水系感染症ウイルスが陽性となった幾つかの試料について、ICC-PCR 法による定量を実施したところ、エンテロウイルス及びロタウイルスが感染力を有する状態でそれぞれ 10 MPN/L 程度、1-3 MPN/L 程度存在する可能性があることが明らかとなった。また、エンテロウイルスの定量においては、PMAxx-Enhancer-PCR 法と ICC-PCR 法の間の陽性/陰性の結果が一致したことから、エンテロウイルスの感染力評価手法の代替として PMAxx-Enhancer-PCR 法を活用できる可能性が示唆された。

河川の増水時の水質変動において、微生物リスクがどのように影響を受けているかを定量的に把握することを目的として、濁度に加え、大腸菌の迅速測定による水質変動把握を実現するため、 β -glucuronidase (GUS) 活性を測定する手法の妥当性を検討した。流入下水に対して、培養法と GUS 活性に非常に高い相関がみられたため、リアルタイムに近い水中の大腸菌測定が可能であることを確認した。次年度以降、水道原水の水質変動の把握に用いることが可能と考えられる。

厳格な濁度管理 (0.14 NTU 以下) を行っている国内の 4 つの浄水場から 12 カ月間にわたって採取した実水を用いて、遊離塩素によるコクサッキーウイルス B5 (CVB5) の不活化効率について検討した。その結果、CVB5 の塩素消毒はあまり水質に影響されない可能性があることがわかった。日本の濁度管理は、塩素消毒の効率をコントロールする間接的な役割を担っている可能性が示唆された。

浄水処理プロセスにおけるウイルス除去遺伝子マーカーとして有用な PMMoV の検査方法を

確立することを目的として、原水、ろ過水、浄水試料を用いた検査方法の評価を行った。Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit を用いた直接抽出・精製法を原水試料を用いて評価した結果、当該キットによる PMMoV の検出結果は陰電荷膜法による濃縮を行う方法と概ね一致しており（一致率は 93%）、PMMoV 濃度の測定値は当該キットの方が有意に高かった（対応のある t 検定、 $P < 0.01$ ）。また、ろ過水および浄水試料を用いた評価では、当該キットを用いて 10^{3-4} copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を検出できること、陰電荷膜法により得られたウイルス濃縮液全量から当該キットを用いてウイルス RNA を抽出・精製することで、 10^2 copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を測定できることが示された。

研究分担者と研究協力者が所属する 7 機関で共通のろ過水試料に含まれる PMMoV 濃度を測定し比較した。PMMoV 濃度がおよそ 10^5 、 10^4 、 10^3 copies/L のオーダーで含まれるように調製した高濃度、中濃度、低濃度試料は、それぞれの機関で概ね同様の測定濃度だった。同一濃度の試料では、測定濃度の差は最大でもおよそ 1 log であったことから、ろ過水における PMMoV の管理目標値として「 10^4 copies/L のオーダー以下」と設定することは、検査方法の測定精度の点からも実情に合うと考えられた。

A. 研究目的

ウイルス分科会では、水道における病原ウイルスのリスク管理方法として、浄水処理プロセスにおけるウイルス除去遺伝子マーカーにトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) を用いること、および塩素消毒による病原ウイルスの不活化を保證するパラメータとして CT 値 (C : 遊離塩素濃度 $\times T$: 接触時間) を用いることを検討した。令和 4 年度から令和 5 年度にかけては、PMMoV の管理目標値を設定するための前提条件となるデータの蓄積および水道事業体において検査を運用する際の条件を整備することを目的として、以下に具体的な目的・概要を示す 5 つの研究タスクを実施した。

- 1) 水道原水において感染力を有する病原ウイルスの実態調査
- 2) 河川の増水時の水質変動において微生物リスクがどのように影響を受けるかの定量的把握
- 3) 遊離塩素によるコクサッキーウイルス B5 の不活性化に及ぼす水質の影響評価
- 4) PMMoV 検査方法の評価
- 5) PMMoV 検査方法の測定精度の評価

これらのタスクの具体的な目的・概要を以下に示す。

A1. 水道原水において感染力を有する病原ウイルスの実態調査

本研究では、水試料中のウイルスを感染力を保持した状態で濃縮・回収可能な粉末活性炭吸着と UF 膜濃縮を組み合わせたウイルス濃縮法を適用すると共に、PMA-PCR 法の改良法である PMAxx-

Enhancer-PCR 法¹⁾、並びに ICC-PCR 法によるウイルス定量を適用することにより、水道原水における感染力を有する水系感染症ウイルスの存在実態を明らかにすることを目的とした。

このタスクでは、改良したウイルス濃縮法を水道原水として利用されている河川水に適用し、PCR 法単独に加え、PMAxx-Enhancer-PCR 法及び ICC-PCR 法によるウイルス定量を実施することにより、感染力を有する水系感染症ウイルスの存在実態調査を実施した。

A2. 水系感染リスク管理の向上に向けた水道原水の微生物濃度変動の評価

水道水の微生物学的安全性は、水道水質基準において大腸菌が検出されないことと規定されているが、大腸菌の不在だけでは水中のウイルス、原虫類に対する安全性は不十分であることが知られている。また、一般的に我が国では水中ウイルス濃度は原虫類より高く、水系感染リスクは相対的に大きい。

定量的微生物リスク評価では、モンテカルロ法により微生物濃度を確率密度に応じてランダムに設定して 1 日ごとのリスクを繰り返し計算し、合計して年間感染確率を算出している。年間感染確率は、多くの場合、極端に微生物濃度の高い日によってほとんどを占められていることが分かっており²⁾、水系感染においては異常事態におけるリスク管理が重要であると考えられる。

そこで、本研究では河川の増水時の水質変動において、微生物リスクがどのように影響を受けているかを定量的に把握することを目的とする。

A3. 遊離塩素によるコクサッキーウイルス B5 の不活性化に及ぼす水質の影響評価

遊離塩素のウイルス不活化効果は pH によって異なることが広く知られており、USEPA ガイダンスマニュアルでは、温度と pH によって消毒剤濃度×接触時間 (CT) の推奨値を提示している³⁾。最近の研究では、pH と温度以外の水源水質 (塩化物濃度、濁度、水質マトリックスなど) もウイルス不活性化の効率に影響を与えるとされている⁴⁻⁶⁾。例えば、Wati ら (2019) は、CVB5 不活性化の効率は、濁度 20 NTU では、濁度 5 NTU 未満に比べ低くなることを報告している。しかし、このような効果は、日本の場合は濁度 0.1 度 (約 0.14 NTU) 以下、TOC 濃度が低いなど、浄水処理に関連する条件下でほとんど検証されていない。そこで、このタスクでは、厳格な濁度管理 (0.14 NTU 以下) を行っている国内の 4 つの浄水場から 12 カ月間にわたって採取した実水を用いて、遊離塩素によるコクサッキーウイルス B5 (CVB5) の不活化効率について検討した。

A4. PMMoV 検査方法の評価

令和 3 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究」微生物 (ウイルス) 分科会の研究では、市販の核酸抽出・精製キットを用いて、水道水試料に 10^3 copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を簡便に検査できることが示された⁷⁾。また、水道事業者が調査研究を目的としてろ過水や浄水試料中の PMMoV を測定するには、さらに低い濃度域も測定できる方法も望まれた。このタスクでは、当該キットを用いて国内 21 箇所の浄水場の原水試料中の PMMoV を測定し、当該キットの有用性を示すこと、および陰電荷膜法による濃縮と当該キットを組み合わせ、ろ過水や浄水試料に 10^2 copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を測定できることを示すことを目的とした。

A5. PMMoV 測定精度の評価

ウイルス分科会では、定量的微生物リスク評価に基づき、ろ過水における PMMoV の管理目標値として 10^4 copies/L のオーダー以下を提案した⁸⁾。このタスクでは、検査方法の測定精度にも基づいた管理目標値を設定するために、研究分担者と研究協力者が所属する 7 機関において共通のろ過水試料に含まれる PMMoV を測定し、測定値のばら

つきの範囲を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

以下にタスクごとの研究方法の概要を示す。より詳細な方法は、研究分担者による研究報告書を参照されたい。

B1. 水道原水において感染力を有する病原ウイルスの実態調査

改良したウイルス濃縮法を水道原水として利用されている河川水に適用し、PCR 法単独による水系感染症ウイルスの存在実態調査を実施した。また、感染力を有する水系感染症ウイルスの存在実態を明らかにするため、PMAxx-Enhancer-PCR 法及び ICC-PCR 法によるウイルス定量を実施した。2023 年 1 月から 12 月に浄水場において採水した水道原水 A (pH: 6.8–7.3, 濁度: 5.7–35.2 NTU, DOC: 1.4–5.7 mg/L, UV260: 0.05–0.19 cm^{-1} , アルカリ度: 30.6–45.2 mg- CaCO_3 /L) 30 L を 10 L ずつ 3 つに分け、活性炭吸着処理を実施した。この後、活性炭吸着処理水をメンブレンフィルター (膜孔径: 0.45 μm) にてろ過し、得られた処理水 30 L を 10 L ずつ 3 つに分けた後、UF 膜濃縮を 3 つの UF 膜を用いて約 4 $^{\circ}\text{C}$ (低水温条件) で実施することにより、それぞれ 5 mL、すなわち、3 つの膜の合計 15 mL (10 L \times 3 \rightarrow 5 mL \times 3) まで精製・減容した。この後、0.01 M リン酸バッファ 5 mL、あるいはヘキサメタリン酸ナトリウム (分散剤; 最終濃度: 0.01% [w/v])、Tween 80 (界面活性剤; 最終濃度: 0.5% [v/v])、アンチフォーム A (発砲防止剤; 最終濃度: 0.001% [v/v]) を添加した 0.01 M リン酸バッファ 5 mL (試薬添加条件) をそれぞれの UF 膜の表面に通水し (合計 15 mL: 5 mL \times 3)、合計 30 mL をメンブレンフィルター (膜孔径: 0.45 μm) にてろ過することにより、水道原水中に存在するウイルスを回収・濃縮した (濃縮試料)。また、0.01 M リン酸バッファ 10 mL、あるいは前述した試薬添加した 0.01 M リン酸バッファ 10 mL (試薬添加条件) を UF 膜の通水方向とは逆の方向からそれぞれの UF 膜に通水し (合計 30 mL: 10 mL \times 3)、メンブレンフィルター (膜孔径: 0.45 μm) にてろ過することにより、UF 膜に残存したウイルスを回収した (逆洗試料)。濃縮試料及び逆洗試料のウイルス濃度をリアルタイム定量 PCR 法、PMAxx-Enhancer-PCR 法、ICC-PCR 法にて定量し、濃縮試料と逆洗試料の合計のウイルス量を求めることにより、水道原水におけるウイルス濃度を

算出した。なお、ウイルス濃度の算出においては、濃縮工程におけるウイルスの回収率は 100%と仮定した。

B2. 水系感染リスク管理の向上に向けた水道原水の微生物濃度変動の評価

水質変動については、迅速に測定可能な水質パラメータとして濁度が広く用いられている。本研究では、濁度に加え、Coliminder (VWM Solutions, Vienna) を用いて大腸菌の迅速測定を実施した。本手法は、 β -glucuronidase (GUS) 活性を測定することにより、リアルタイムに近い水中の大腸菌測定を実現したものである^{9,10)}。

Coliminder の測定精度を調べるため、下水流入水を用いてリン酸緩衝液による希釈列を作成し、培養法との比較を行った。培養法としては、Chromocult Coliform Agar を用い、青紫のコロニーを大腸菌としてカウントした。

B3. 遊離塩素による CVB5 の不活性化に及ぼす水質の影響

(1) ウイルスの増殖・精製

本研究では、CVB5 Faulkner 株を使用した。CVB5 は、BGM 細胞によって増殖され、密度勾配遠心分離によって精製した¹¹⁾。精製したウイルスストックは、実験を行うまで -20°C で保存した。感染性 CVB5 は、96 ウェルプレート上の BGM 細胞を用いた最確数 (MPN) 法により計測した。サンプルは 1 希釈につき 5 ウェルで 10 倍で連続希釈した。陽性ウェルの数は顕微鏡でカウントし、R パッケージ {MPN} で解析した¹²⁾。

(2) 消毒試験に用いた水試料

A, B, C, D の水源は、それぞれ河川水、伏流水、河川水、湖水である。サンプリング期間は 2021 年 2 月 24 日から 2022 年 2 月 28 日で、A 処理場と C 処理場で 20 サンプル、B 処理場で 7 サンプル、D 処理場で 14 サンプル、合計 61 サンプルを採取した。これらの水サンプルは、消毒直前の工程水を採取した。水サンプルは輸送後、 -20°C で保存し、解凍したサンプルを消毒実験に使用した。処理場 A および C から採取した塩素処理済みの水サンプルについては、実験前に室温で一晩静置することで脱塩素処理を行った。

(3) 消毒試験

ウイルス原液 (50 μL) を試験水 (20 mL) に添

加し、フラスコ内で静かに攪拌した。試験水は、 $19.6 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ 、10 mM リン酸緩衝液 (1 mL) (和光, 日本) により緩衝された pH 7.0 に維持した。次に、塩素原液を試験水中に添加し、初期濃度 0.6 mg/L とした。25 秒ごと (0 秒, 25 秒, 50 秒, 75 秒) に 0.5 mL ずつ採取し、チオ硫酸ナトリウム (5 μL , 5000 mg/L) と混合して残留遊離塩素を中和した。採取したサンプルは、ウイルス測定に使用した。すべての実験は二回ずつ実施した。ガラス器具は、実験前に 50 mg/L の次亜塩素酸ナトリウムで一晩浸し、Milli-Q 水ですすいで塩素消費を抑制した。遊離塩素濃度は、DR890 色差計 (HACH, USA) の N,N-diethyl-p-phenylenediamine 比色法を用いて測定した。不活化速度定数 (k) ($\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}$) は、Chick-Watson モデル ($N/N_{T0} = e^{-kCT}$) に適合させて推定した。

B4. PMMoV 検査方法の評価

(1) 原水試料を用いた核酸抽出・精製キットの評価

2022 年 10 月および 2023 年 1 月に国内 21 箇所の浄水場において原水試料 (N=42) を採水した。これまでの実態調査⁷⁾と同様に、国内の主要な河川流域をカバーするように北海道から九州・沖縄地方の浄水場を選定した。試料は、冷蔵状態で国立保健医療科学院に輸送した。

試料 1 L に含まれる PMMoV は、プロセスコントロールとして MNV を添加した後に、陰電荷膜法¹³⁾により濃縮した。回収したウイルス濃縮液のうち 1 mL から、NucliSENS mini MAG (bioMérieux) を用いてウイルス RNA を抽出・精製した。水試料からウイルス RNA を直接抽出・精製するキットとしては、Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid (WETNA) Kit を検討した。すなわち、40 mL (阻害が大きい場合には 4 mL) の原水試料に MNV をおよそ 10^7 copies 添加・混合し、キットを用いて 40 μL の RNA 溶液を精製した。MNV および PMMoV の RNA 濃度は、既往のプライマー・プローブ、RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific), および LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics) を用いたリアルタイム RT-PCR 法により定量した。

(2) 陰電荷膜法と Promega WETNA Kit を組み合わせた測定方法の評価

国内 21 箇所の浄水場において、2023 年 1 月にろ過水と浄水試料 (それぞれ N=21) を採水した。浄水場 D, E, L, T のろ過水試料については、

Promega WETNA Kit を用いたウイルス RNA の直接抽出・精製法と陰電荷膜法により得られたウイルス濃縮液全量 (10 mL) から当該キットを用いて RNA を抽出・精製する方法を比較した。ろ過水試料の体積は、Promega WETNA Kit で直接抽出する試料は 40 mL、陰電荷膜法で濃縮する試料は 1 L とした。試料 1 L から得られたウイルス濃縮液全量から RNA を抽出することで、原理的には水試料中に 10^2 copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を測定できる方法となる。さらに、本方法を 8 箇所の浄水場 (A, C, F, J, K, M, P, Q) で採水されたろ過水と浄水試料 (1 L) に適用した。上述したリアルタイム RT-PCR 法を用いて、MNV および PMMoV 濃度を定量した。

B5. PMMoV 測定精度の評価

研究分担者と研究協力者が所属する 7 機関において、PMMoV が含まれる共通のろ過水試料を分析し、濃度の測定値を比較した。2024 年 1 月に国内の浄水場において採水されたろ過水試料に、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過した流入下水試料を加えることで PMMoV を添加した。調製した試料原液 (PMMoV 濃度およそ 10^5 copies/L のオーダー) を「高濃度試料」とし、ろ過水試料で 10 倍、100 倍希釈したものをそれぞれ「中濃度試料」、「低濃度試料」と呼ぶこととした。試料は国立保健医療科学院において調製し、研究分担者と研究協力者が所属する 6 機関に冷蔵状態で送付した。

以下の試薬・キット等を 7 機関で共通して用いることとし、それ以外の消耗品、リアルタイム PCR 装置 (研究分担者による詳細研究報告書を参照) はそれぞれの機関で保有するものを使用した。高濃度、中濃度、低濃度試料それぞれ 40 mL から Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit のプロトコールにしたがって核酸を抽出した。核酸抽出は、3 併行で実施した。リアルタイム PCR で核酸試料を測定する際は、抽出核酸試料原液と 10 倍希釈液をそれぞれ 1 ウェルずつ試験することとし、原液と 10 倍希釈液の測定値を比較することで、RT-PCR 阻害の有無を評価した。

【共通で用いた試薬・キット】

- 核酸抽出キット : Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (A2991, Promega)
- リアルタイム RT-PCR 試薬キット : One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (RR600A, タカラバイオ株式会社)

- プライマー, TaqMan プローブ : PMMV-FP1-rev, PMMV-RP1, PMMV-Probe1
- 検量線用のポジティブコントロール : Strings DNA Fragments (直鎖, 2 本鎖, 塩基長 590 bp, Thermo Fisher Scientific)

C. 結果及び考察

以下にタスクごとの研究結果の概要を示す。より詳細な結果は、研究分担者による研究報告書を参照されたい。

C1. 水道原水において感染力を有する病原ウイルスの実態調査

(1) 水道原水 A におけるウイルスの存在実態

2023 年 1 月及び 2 月に採水した原水については低水温条件にて、3 月から 12 月に採水した原水については試薬を添加した低水温条件にて濃縮を実施し、濃縮試料及び逆洗試料のウイルス濃度をリアルタイム定量 PCR 法にて定量することにより、水道原水におけるウイルス濃度を算出した (図 1)。昨年度報告した 2022 年 4 月から 12 月のウイルス濃度の傾向と同様に、対象とした水道原水においては、採水時期による濃度変動が見られたものの、エンテロウイルス及びロタウイルスが 10^{3-5} copies/L 程度の濃度で存在していることが確認された。また、2023 年 1 月、2 月、4 月、12 月に採水した原水においては、アデノウイルス、ノロウイルスの両方、あるいはいずれかが陽性となり、特に、アデノウイルスについては、 10^{3-5} copies/L 程度の濃度で存在する可能性があることが明らかとなった。これに対し、サポウイルスについては、いずれの採水日においても定量下限値 (10^{2-3} copies/L) 以下であった。一方、PMMoV については、昨年度報告した傾向と同様に、対象とした水系感染症ウイルスに比べて 10 倍以上高い 10^{6-7} copies/L 程度の高濃度で存在していることが確認された。

(2) PMAx-Enhancer-PCR 法及び ICC-PCR 法による水系感染症ウイルスの定量

PCR 法単独によるウイルス定量においてエンテロウイルス及びロタウイルスが陽性となった 2023 年 1 月、2 月、3 月の試料について、PMAxx-Enhancer-PCR 法による定量を実施した (表 1)。1 月、2 月の試料においては、PMAxx-Enhancer-PCR 法にて定量した場合、いずれのウイルスも定量下限値以下の値となり、PCR 法単独にて得られた濃

度と比べて大きな差異が確認された。従って、これらの試料中に存在するエンテロウイルス及びロタウイルスのほとんどは、PMAxx がウイルス粒子内部まで透過可能な状態、すなわち、外殻タンパク質の損傷により感染力を失った状態である可能性が示唆された。一方、3月の試料においては、ロタウイルスについては、定量下限値以下の値となったのに対し、エンテロウイルスについては、PMAxx-Enhancer-PCR 法にて得られた濃度は、PCR 法単独にて得られた濃度と同程度の値となった。従って、3月の試料中に存在するエンテロウイルスは、外殻タンパク質の損傷が無く、感染力を有する完全体の状態である可能性が示唆された。

同一の試料について、ICC-PCR 法による定量を実施した(表1)。エンテロウイルスについては、PMAxx-Enhancer-PCR 法にて得られた濃度が定量下限値以下の値となった1月、2月の試料においては、ICC-PCR 法にて得られた濃度も定量下限値以下の値となった。一方、PMAxx-Enhancer-PCR 法にて得られた濃度が PCR 法単独にて得られた濃度と同程度の値となった3月の試料においては、ICC-PCR 法にて得られた結果も陽性となり、エンテロウイルスが感染力を有する状態で 10^1 MPN/L 程度存在することが明らかとなった。また、PMAxx-Enhancer-PCR 法と ICC-PCR 法で定量下限値は大きく異なるものの、両定量法間の陽性/陰性の結果が一致したことから、エンテロウイルスの感染力評価手法の代替として PMAxx-Enhancer-PCR 法を活用できる可能性が示唆された。

一方、ロタウイルスについては、いずれの試料においても、PMAxx-Enhancer-PCR 法にて得られた濃度は定量下限値以下の値となったのに対し、1月及び3月の試料においては、ICC-PCR 法にて得られた結果は陽性となり、ロタウイルスが感染力を有する状態で $10^{0.1-0.4}$ MPN/L、すなわち、1-3 MPN/L 程度存在することが明らかとなった。上述したように、両定量法間で定量下限値が大きく異なることから、PMAxx-Enhancer-PCR 法にて得られた定量下限値以下の値と ICC-PCR 法にて得られた濃度の大小関係を議論することはできないことから、ロタウイルスの感染力評価手法の代替としての PMAxx-Enhancer-PCR 法の有効性については、更なる検討が必要であると考えられた。

C2. 水系感染リスク管理の向上に向けた水道原水の微生物濃度変動の評価

結果を図2に示す。下水流入水に存在する大腸菌について、培養法による計測数と、GUS 活性が非常に高い相関を示していることが確認できた。

今後は水道原水となる地表水を対象として、大腸菌の連続監視を実施するとともに、同時に採水して培養法に依る大腸菌測定、ウイルス濃度の測定などを実施し、リスク評価につながる知見を得る予定である。

C3. 遊離塩素による CVB5 の不活性化に及ぼす水質の影響評価

塩素消毒の不活化速度定数は、A 処理場 ($K_A = 8.2 \pm 3.0$), B 処理場 ($K_B = 9.4 \pm 2.2$), C 処理場 ($K_C = 6.7 \pm 2.5$), D 処理場 ($K_D = 7.5 \pm 3.5$) であり、サンプル間で有意差はなかった。この結果は、試験した飲料水サンプル間で塩素化の効率が比較的類似していることを示している。本研究における 4-log 不活性化の CT 値は $1.06 \sim 1.28$ mg.min/L であり、 1.02 mg.min/L¹⁴⁾ および $1.15-1.19$ mg.min/L¹⁾ と報告した以前の研究と一致した。これらの先行研究は、今回の研究と同様の条件(CVB5 Faulkner 株, pH=7, 水温=20°C)で行われたが、実際の飲料水の代わりに PB バッファーが使用された。したがって、CVB5 に対する塩素消毒の効率は、試験した飲料水と PB バッファーと同様であったと考えられる。このことは、今回の試験で使用した飲料水の水質が塩素消毒の効率を阻害していないことを示唆しているのかもしれない。

これまで、水質特性(全有機炭素[TOC], アルカリ性, 硬度, イオン強度, 濁度など)が塩素消毒の効率に影響を及ぼす可能性があるという理論的に考えられてきた。しかし、今回の研究の結果、飲料水のこれらのパラメータは、特に濁度レベルが制御された日本の飲料水(<0.1度)では、遊離塩素による消毒の効率に影響を与える重要な要因ではない可能性があることが示された。実際、いくつかの先行研究では、AdV2, CVB5, E1, MNV のウイルス不活化率は、イオン強度レベルの高い飲料水において高いことが報告されている¹⁵⁾。さらに、カルシウム硬度として CaCO_3 (0-150 mg/L) は、遊離塩素による AdV の不活性化に影響しないことが判明し、アルカリ度が 150, 200, 300 mg/L と増加しても AdV2 に対する塩素除去効率に影響しないことが報告された¹⁶⁾。以前の研究では、TOC 濃度の異なる飲料水 (1.9, 2.2, 18 mg/L) を比較した場合、TOC の増加と不活性化率の低下との関連は観察されなかった¹⁵⁾が、今回の研究では、

TOC の増加による不活性化率の低下は観察されなかった。

なお、本研究では、飲料水の温度と pH を制御しているため、これらの因子が塩素消毒の効率に及ぼす影響は不明である。一般に、ウイルスの不活性化速度は、温度の低下や pH の上昇に伴って低下することが知られている。実際、先行研究において、5°C の緩衝液中で CVB5 が $4 \log_{10}$ 減少するのに必要な CT 値は、pH 7 では 7.4 mg.min/L であったが、pH 8 では 10 mg.min/L となることが報告された⁴⁾。また、飲料水中の CBV5 の遊離塩素による不活性化を 15°C で調べたところ、 $3 \log_{10}$ のウイルス減少に必要な CT 値は、pH が 7 から 8 に上がるにつれて 1.0 mg.min/L から 1.6 mg.min/L に増加することがわかった。これらのことから、水温と pH が飲料水中のウイルスの塩素消毒不活性化率に、より強く影響する可能性が示唆された。日本の濁度管理は、遊離塩素消毒の不確実性を低減する間接的な役割を果たし、水系ウイルスのリスク低減に寄与していると考えられる。

C4. PMMoV 検査方法の評価

(1) 原水試料を用いた核酸抽出・精製キットの評価

2022 年 10 月に採水された原水試料を陰電荷膜法で濃縮した結果、MNV 回収率は 3 試料で 5.7–9.3% だったが、それ以外の 18 試料では 10–51% であり、比較的良好な回収率だった。PMMoV は、浄水場 D および U を除いた 19 の試料から 3.2–5.9 copies/L の濃度で検出された（検出率は 90%）。Promega WETNA Kit では MNV 回収率が 10–132% だった。PMMoV は、上記の浄水場 D および U に加えて浄水場 M も不検出だった（検出率は 86%）。PMMoV の検出濃度は、4.0–6.4 copies/L であり、Promega WETNA Kit の方が陰電荷膜法よりも有意に高かった（対応のある t 検定、 $P < 0.01$ ）。

2023 年 1 月の試料では、陰電荷膜法による MNV 回収率は 1 試料で 5.6% だったが、残りの 20 試料では 11–50% であり、10 月の試料と同程度だった。Promega WETNA Kit の MNV 回収率は 3.2–150% であり、一部の試料（浄水場 H）では回収率が 10% 未満となる場合も確認された。PMMoV は、浄水場 C および D を除いて、両法による検出・不検出の結果が一致していた。PMMoV の検出濃度も 10 月の試料と同程度であり、Promega WETNA Kit の方が陰電荷膜法よりも有意に高かった（対応のある t 検定、 $P < 0.05$ ）。

10 月と 1 月の採水試料を合わせて比較した結

果（図 3）、PMMoV 検出結果の一致率は 93% であり、検出濃度は Promega WETNA Kit の方が陰電荷膜法よりも有意に高かった（対応のある t 検定、 $P < 0.01$ ）。以上の結果から、Promega WETNA Kit は、水道原水中の PMMoV の測定にも有用であることが示された。ただし、試料 40 mL から抽出・精製する際には、抽出・精製効率の低下に注意する必要がある。抽出 RNA の原液に加えて 10 倍希釈液をリアルタイム RT-PCR に供するなど、抽出・精製や RT-PCR における阻害を評価することが重要である。

(2) 陰電荷膜法と Promega WETNA Kit を組み合わせた測定方法の評価

浄水場 D, E, L, T から収集したろ過水試料を用いて、Promega WETNA Kit を用いた直接抽出・精製法と陰電荷膜法に当該キットを組み合わせた方法を評価した（表 2）。MNV 回収率は、それぞれの測定方法で、38–116%、66–139% であり、良好な回収率だった。PMMoV の検出濃度は、浄水場 E のろ過水試料では、WETNA Kit の方が 1 オーダー高く測定されたが、それ以外の試料では、50% の範囲内（リアルタイム PCR におけるおよそ 1 サイクルの誤差範囲内に相当）であり、同程度だった。

次に、陰電荷膜法に Promega WETNA Kit を組み合わせた方法を 8 箇所の浄水場で採水されたろ過水、浄水試料に適用した（表 3）。MNV 回収率は、ろ過水試料で 24–113%、浄水試料で 25–69% だった。PMMoV は、 $7.0 \times 10^1 \sim 6.0 \times 10^3$ copies/L の濃度で 10 試料から検出された。以上の結果から、陰電荷膜法と Promega WETNA Kit を組み合わせた方法を用いることで、PMMoV が $10^3 \sim 10^4$ copies/L のオーダーで含まれる試料では、直接抽出・精製法と同程度の測定値が得られること、および PMMoV が 10^2 copies/L のオーダーで含まれる試料でも測定できることが示された。この方法を用いることで、管理目標値の候補（ 10^4 copies/L のオーダー）よりも 2 オーダー低い濃度域のデータも得られるため、水道事業体において浄水処理プロセスの PMMoV 除去効率の把握や PMMoV を用いたウイルスのリスク管理の実施につながる事が期待される。

C5. PMMoV 測定精度の評価

PMMoV の検査方法は、1) ウイルス核酸の抽出・精製と 2) リアルタイム RT-PCR によるウイ

ルス遺伝子数の定量の大きく分けて2つの作業から構成されるが、測定精度を考慮してPMMoVの管理目標値を設定するために、水道事業体を含む7機関間でのPMMoV測定値のばらつきを調査した(表4)。それぞれの機関において、「高濃度試料」、「中濃度試料」、「低濃度試料」は、概ね、 10^5 、 10^4 、 10^3 copies/Lのオーダーで測定された。機関Dでは業務の都合により試料送付から3週間以上経過してからの測定であったため、PMMoVの分解と核酸抽出阻害により測定濃度が低くなったと考えられた。そのため、「中濃度試料」と「低濃度試料」では、3併行のうち定量値が得られない試料もあった。機関Eでは、それぞれの濃度で作業者を変更したため、作業者による差も測定濃度の差に含まれたと考えられた。

7機関における「高濃度試料」の測定値は、 $7.0 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^5$ (4.8–5.9 log) copies/Lの範囲であり、最小値と最大値ではおよそ1 logの差が見られた。機関Dの測定値を除いた場合、「中濃度試料」は $1.7 \times 10^4 \sim 6.7 \times 10^4$ (4.2–4.8 log) copies/Lの範囲であり、最小値と最大値の差は0.6 logだった。「低濃度試料」では、 $1.4 \times 10^3 \sim 9.2 \times 10^3$ (3.1–3.9 log) copies/Lの範囲であり、最小値と最大値では0.8 logの差が見られた。試料送付から1週間程度以内に核酸抽出・精製が行われた場合には、中濃度、低濃度試料におけるばらつきの範囲は1 log未満だった。したがって、ろ過水におけるPMMoVの管理目標値を「 10^4 copies/Lのオーダー以下」と設定することは、採用する検査方法の精度を考慮しても現実的であると考えられた。ただし、機関内における作業者による測定濃度の差が見られたため、キットを用いた核酸・抽出精製操作にある程度習熟する必要がある。核酸抽出・精製やリアルタイムPCRの操作、データの解釈について、研修等を実施することも検討する必要がある。

リアルタイムRT-PCRによる定量は、遺伝子の増幅曲線(蛍光強度)が閾値の線(threshold line)と交わるサイクル数(Ct値)を測定し、濃度の常用対数値をX軸に、Ct値をY軸にプロットした検量線を用いて行われる。BustinらによるリアルタイムPCRによる定量に関するガイドライン¹⁷⁾では、測定精度の評価において変動係数(CV)は、Ct値ではなくコピー数や濃度に対して算出すべきとされている。本研究では、Ct値との間に直線関係が成立する濃度の常用対数値について変動係数を求めることとした。それぞれの機関において3併行で実施した併行精度(変動係数)は、「高

濃度試料」が0.1~6.3%、「中濃度試料」が1.9~8.9%、「低濃度試料」が1.5~9.7%だった。また、3併行のうち、1試料でのみ測定濃度が50%以上低い(1Ct以上大きい)場合も見られたため、市販のキットを用いた核酸抽出・精製におけるばらつきもあることがわかった。今後は、リアルタイムPCRを用いた遺伝子数の測定における精度の評価に関して、合理的な方法を検討する必要がある。

E. 結論

水道原水Aにおいては、PCR法単独にて定量されたアデノウイルス、エンテロウイルス、ロタウイルスが 10^{3-5} copies/L程度、また、トウガラシ微斑ウイルスが 10^{6-7} copies/L程度存在していることが確認された。

PCR法単独によるウイルス定量においてエンテロウイルス及びロタウイルスが陽性となった試料について、ICC-PCR法による定量を実施したところ、エンテロウイルス及びロタウイルスが感染力を有する状態でそれぞれ10 MPN/L程度、1–3 MPN/L程度存在する可能性があることが明らかとなった。エンテロウイルスの定量においては、PMAxx-Enhancer-PCR法とICC-PCR法との陽性/陰性の結果が一致したことから、エンテロウイルスの感染力評価手法の代替としてPMAxx-Enhancer-PCR法を活用できる可能性が示唆された。

流入下水に存在する大腸菌を用いてColiminderの有用性が確認されたため、次年度において水道原水を対象とした調査に用いることが可能と判断された。

浄水の塩素消毒によるウイルスの不活性化率に水質はあまり影響しない可能性があり、水温やpHが塩素消毒の効率に影響する可能性が高いことを示す証拠となる。

水道事業体において実施可能なPMMoVの検査方法を確立することを目的として、市販の核酸抽出・精製キット(Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit)の有用性を評価した。原水試料を用いた評価では、陰電荷膜法による濃縮を行う方法とPMMoVの検出結果は概ね一致しており(一致率は93%)、当該キットによるPMMoV濃度の測定値は有意に高かった(対応のあるt検定、 $P < 0.01$)。また、ろ過水および浄水試料を用いた評価では、当該キットを用いて、陰電荷膜法により得られたウイルス濃縮液全量(10 mL)からウイル

ス RNA を抽出・精製することで、試料に 10^2 copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を測定できることが示された。

PMMoV 濃度がおよそ 10^5 , 10^4 , 10^3 copies/L のオーダーで含まれるように調製した高濃度、中濃度、低濃度試料は、研究分担者と研究協力者が所属する 7 機関で概ね同様の測定濃度だった。同一濃度の試料では、測定濃度の差は最大でもおよそ 1 log であったことから、ろ過水における PMMoV の管理目標値として「 10^4 copies/L のオーダー以下」と設定することは、検査方法の測定精度の点からも現実に即していると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miura, T., Kadoya, S., Miura, Y., Takino, H., Akiba, M., Sano, D., Masuda, T. (2024). Pepper mild mottle virus intended for use as a process indicator for drinking water treatment: present forms and quantitative relations to norovirus and rotavirus in surface water. *Water Research*, accepted.
 - 2) Canh, V. D., Torii, S., Singhopon, T., Katayama, H. (2023). Inactivation of coxsackievirus B5 by free chlorine under conditions relevant to drinking water treatment. *Journal of Water and Health*, 21(9). <https://doi.org/10.2166/wh.2023.178>
 - 3) Shirakawa, D., Shirasaki, N., Hu, Q., Matsushita, T., Matsui, Y., Takagi, H., Oka, T. (2023). Investigation of removal and inactivation efficiencies of human sapovirus in drinking water treatment processes by applying an in vitro cell-culture system. *Water Research* 236, 119951.
 - 4) Miura, T., Kadoya, S., Takino, H., Sano, D., Akiba, M. (2022). Temporal variations of human and animal Rotavirus A genotypes in surface water used for drinking water production. *Frontiers in Microbiology* 13, 912147.
- ### 2. 学会発表
- 1) Shirakawa, D., Shirasaki, N., Yamashita, R., Matsumura, T., Koriki, S., Matsushita, T., Matsui, Y. Investigating virus reduction efficiencies in coagulation-sedimentation-rapid sand filtration or coagulation-microfiltration by a combination of full-scale studies and lab-scale experiments. IWA World Water Congress & Exhibition, Copenhagen, Denmark, 11-15 September 2022.
 - 2) 富士萌笑, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 塩素処理におけるウイルスの高不活化率の評価: 濃縮法を組み合わせた大容量実験系の適用. 第 58 回日本水環境学会年会, 福岡, 2024/3/6-8.
 - 3) 山口耕平, 白崎伸隆, 松下拓. 感染力評価と外殻タンパク質損傷評価を併用したオゾン処理におけるヒトサポウイルスの不活化特性の把握. 第 58 回日本水環境学会年会, 福岡, 2024/3/6-8.
 - 4) 三浦尚之, 前田暢子, 東城まゆみ, 吉田伸江, 小坂浩司, 増田貴則. 全国の水道原水における PMMoV 遺伝子マーカーと医薬品の実態調査. 第 58 回日本水環境学会年会, 福岡, 同講演集, 146, 2024/3/6-8.
 - 5) 白崎伸隆, 胡秋哈, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦. 汎用細胞増殖系を活用した浄水処理におけるヒトサポウイルスの除去・不活化特性の把握. 第 60 回環境工学研究フォーラム, 山口, 2023/11/29-12/1.
 - 6) 浅川高志, 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. ヒトノロウイルスの浄水処理性評価に向けた高感度に定量可能な革新的ウイルス様粒子の創製. 第 30 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2023/11/9-10.
 - 7) 福井健暉, 川上悟史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 水道原水に存在する病原ウイルスの感染力評価: 活性炭吸着と UF 膜ろ過を組み合わせたウイルス濃縮法の構築と適用. 第 30 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2023/11/9-10.
 - 8) 三浦尚之, 白崎伸隆, 片山浩之, 増田貴則, 松井佳彦. 水道におけるウイルスのリスク管理の国際動向と PMMoV 遺伝子マーカーの有用性. 令和 5 年度全国会議 (水道研究発表会) 東京, 同講演集, 694-695, 2023/10/18-20.
 - 9) 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. トウガラシ微斑ウイルスの水中病原ウイルスに対する代替指標性と実浄水工程における処理性. 第 26 回日本水環境学会シンポジウム, 吹田, 2023/9/20-22.
 - 10) 白川大樹, 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 全国 10 カ所の水道原水における病原ウイルスの存在実態の把握: PMAxx-Enhancer-PCR 法による調査. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023/3/15-17.
 - 11) 浅川高志, 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 培養困難なヒトノロウイルスの浄水

処理性評価に向けた高感度に定量可能な革新的ウイルス様粒子の創製. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023/3/15-17.

- 12) 平岩竜士, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. ウイルス粒子の状態変化はウイルスの凝集沈澱-砂ろ過処理性にどの程度影響するのか?. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023/3/15-17.
- 13) 福井健暉, 川上悟史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 水道原水に存在する病原ウイルスの感染価評価: 活性炭と UF 膜を組み合わせたウイルス濃縮法の構築と適用. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023/3/15-17.
- 14) 三浦尚之, 瀧野博之, 前田暢子, 東城まゆみ, 佐野大輔, 秋葉道宏, 増田貴則. 流入下水および表層水試料からの新型コロナウイルス RNA 検出手法の検討. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 同講演集, 372, 2023/3/15-17.
- 15) 白崎伸隆, 胡秋晗, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦. 汎用細胞増殖系を活用した下痢症ウイルスの浄水処理性の評価. ウイルス性下痢症研究会第 33 回学術集会, 長崎, 2022/11/12.
- 16) 白崎伸隆, 胡秋晗, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦. 汎用細胞増殖系を活用した浄水処理工程におけるヒトサポウイルスの未知動態の解明. 第 29 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2022/11/3-4.
- 17) 白川大樹, 松村拓哉, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 低圧膜ろ過処理を導入した実浄水処理場におけるウイルスの除去性評価 令和 4 年度日本水道協会全国会議 (水道研究発表会), 名古屋, 2022/10/19-21.
- 18) 三浦尚之. 水道水源における病原微生物汚染とリスク管理. 第 25 回日本水環境学会シンポジウム, 東京, 同講演集, 83-84, 2022/9/6-7.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む.)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

- 1) Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Koriki, S. (2020). Suitability of pepper mild mottle virus as a human enteric virus surrogate for assessing the efficacy of thermal or free-chlorine disinfection processes by using infectivity assays and enhanced viability PCR. *Water Research* 186: 116409.
- 2) 真砂佳史, 大垣眞一郎, 片山浩之, 橋本温, 平田強. (2000). 相模川流域の水供給におけるクリプトスポリジウム起因のリスク評価, 土木学会第 55 回年次学術講演会, VII-78
- 3) US EPA. Guidance Manual for Compliance with the Filtration and Disinfection Requirements for Public Water Systems Using Surface Water Sources, 1991.
- 4) Cromeans, T.L., Kahler A.M., Hill, V.R. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 1028-1033, 2010.
- 5) Szczuka, A., Horton, J., Evans, K.J., DiPietri, V.T., Sivey, J.D., Wigginton, K.R. Chloride enhances DNA reactivity with chlorine under conditions relevant to water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 56, 13347-13356, 2022.
- 6) Wati, S., Robinson, B.S., Mieog, J., Blackbeard, J., Keegan, A.R. Chlorine inactivation of coxsackievirus B5 in recycled water destined for non-potable reuse. *Journal of Water and Health* 17, 124-136, 2019.
- 7) 秋葉道宏, 三浦尚之, 小田琢也, 佐野大輔, 門屋俊祐, 三浦耀平, 瀧野博之. (2022). 原水におけるロタウイルスの遺伝子型分布および水道水におけるトウガラシ微斑ウイルスの実態と検査方法の検討, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究」令和 3 年度研究報告書, 47-57.
- 8) 三浦尚之. (2023). 水道におけるウイルスのリスク管理の国際動向と水源流域, 浄水処理, 排水処理プロセスにおける PMMoV 遺伝子マーカーの実態, 厚生労働省令和 5 年度第 1 回水道における微生物問題検討会, 資料 3.
- 9) Burnet, J.B., Dinh, Q.T., Imbeault, S., Servais, P., Dorner, S., & Prévost, M. (2019). Autonomous online measurement of B-D-glucuronidase activity in surface water: is it suitable for rapid E. coli monitoring? *Water Research*, 152, 241-250.

- 10) Burnet, J.B., Habash, M., Hachad, M., Khanafer, Z., Prévost, M., Servais, P., Sylvestre, E., & Dorner, S. (2021). Automated targeted sampling of waterborne pathogens and microbial source tracking markers using near-real time monitoring of microbiological water quality. *Water (Switzerland)*, 13(15), 2069.
- 11) Torii, S., Furumai, H., Katayama, H. Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater. *Science of The Total Environment* 756, 143067, 2021.
- 12) Ferguson, M., Ihrie, J.. MPN: Most Probable Number and Other Microbial Enumeration Techniques, 2019.
- 13) Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol.* 68(3), 1033-9, 2002.
- 14) Torii, S., Corre, M.-H., Miura, F., Itamochi, M., Haga, K., Katayama, K., Katayama, H., Kohn, T. Genotype-dependent kinetics of enterovirus inactivation by free chlorine and ultraviolet (UV) irradiation. *Water Research* 220, 118712, 2022.
- 15) Kahler, A.M., Cromeans, T.L., Roberts, J.M., Hill, V.R. Effects of Source Water Quality on Chlorine Inactivation of Adenovirus, Coxsackievirus, Echovirus, and Murine Norovirus. *Appl Environ Microbiol* 76, 5159–5164, 2010.
- 16) Page, M.A., Shisler, J.L., Mariñas, B.J.. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. *Water Research* 43, 2916–2926, 2009.
- 17) Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55(4), 611-622.

表1. PCR法単独, PMAxx-Enhancer-PCR法, ICC-PCR法による水系感染症ウイルスの定量結果

採水日	エンテロウイルスのlog濃度		
	PCR単独 Log [copies/L]	PMAxx-Enhancer-PCR Log [copies/L]	ICC-PCR Log [MPN/L]
1/13	3.8	≤2.5	≤-0.3
2/27	4.1	≤2.5	≤-0.3
3/24	4.5	4.0	1.1

採水日	ロタウイルスのlog濃度		
	PCR単独 Log [copies/L]	PMAxx-Enhancer-PCR Log [copies/L]	ICC-PCR Log [MPN/L]
1/13	4.4	≤2.5	-0.1
2/27	4.2	≤2.5	≤-0.3
3/24	4.7	≤3.5	0.4

表 2. ろ過水試料の MNV 回収率と PMMoV 濃度比較

浄水場	WETNA (Promega)*		陰電荷膜法+WETNA (Promega)*	
	MNV 回収率 [%]	PMMoV 濃度 [copies/L]	MNV 回収率 [%]	PMMoV 濃度 [copies/L]
D	51	7.6×10^3	123	1.4×10^4
E	38	1.5×10^4	77	1.4×10^3
L	89	1.7×10^3	139	1.4×10^3
T	116	5.2×10^3	66	9.1×10^2

*Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid (WETNA) Kit

表 3. ろ過水, 浄水試料の MNV 回収率と PMMoV 濃度

浄水場	ろ過水試料		浄水試料	
	MNV 回収率 [%]	PMMoV 濃度 [copies/L]	MNV 回収率 [%]	PMMoV 濃度 [copies/L]
A	71	1.9×10^2	45	6.5×10^2
C	34	不検出	25	7.4×10^1
F	113	1.3×10^2	69	2.0×10^2
J	53	7.0×10^2	47	7.0×10^1
K	41	不検出	30	不検出
M	38	不検出	31	不検出
P	24	7.5×10^1	57	6.0×10^3
Q	65	不検出	47	4.4×10^2

表 4. 各機関による PMMoV 濃度測定結果

機関	高濃度試料		中濃度試料		低濃度試料	
	平均濃度 [copies/L]	平均濃度 [log copies/L]	平均濃度 [copies/L]	平均濃度 [log copies/L]	平均濃度 [copies/L]	平均濃度 [log copies/L]
A	2.3×10^5	5.4	1.7×10^4	4.2	1.4×10^3 *	3.1*
B	3.3×10^5	5.5	3.5×10^4	4.5	3.5×10^3	3.5*
C	5.9×10^5	5.8	5.9×10^4	4.8	6.9×10^3	3.8
D	1.3×10^5	5.1	1.5×10^4 **	4.2**	1.2×10^3 *	3.1*
E	7.0×10^4	4.8	3.8×10^4	4.5	5.3×10^3	3.7
F	3.1×10^5	5.5	4.7×10^4	4.7	7.3×10^3	3.9
G	8.0×10^5	5.9	6.7×10^4	4.8	9.2×10^3	3.9

*: 定量下限以下を含む参考値として示した。

** : 3 試料中, 1 試料で得られた濃度を示した。

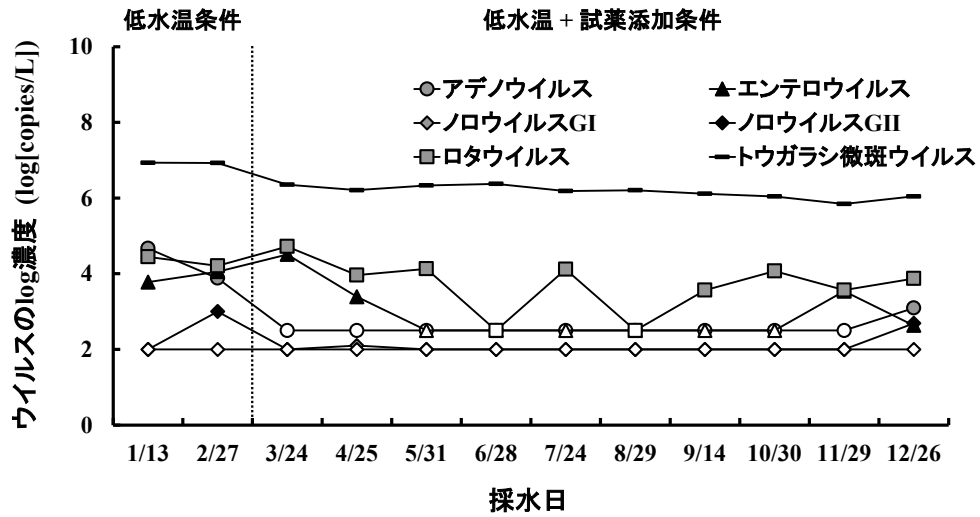


図1. 水道原水 A におけるウイルス濃度 (PCR 法単独による定量, 図中の白抜きは定量下限値以下を示しており, 定量下限値をプロット)

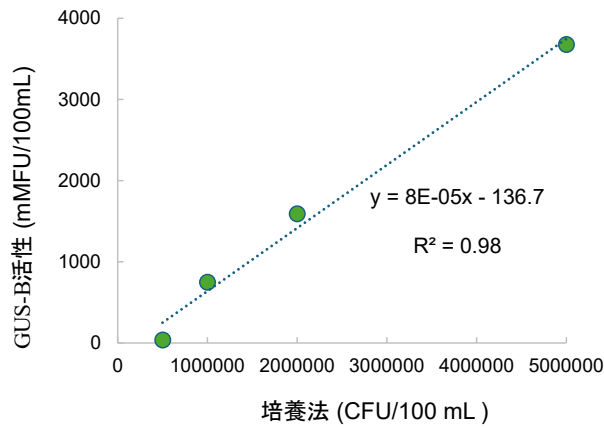


図2. GUS-B 活性と培養法 E. coli の相関

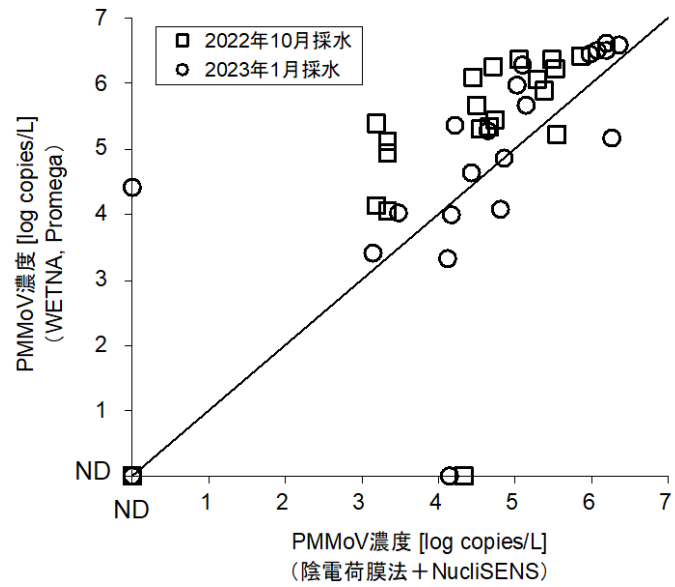


図3. 原水試料中の PMMoV 濃度測定値の比較. 2022 年 10 月, 2023 年 1 月に採水した試料 (それぞれ N=21) について, 検討した二つの方法の測定値を比較する単純プロットを作成した.